

Evolution de la viabilité cellulaire dans les procédés de production de ferments lactiques : effet du type de bactérie sur l'évaluation par cytométrie en flux

THIRY Christophe^a, DELVIGNE Frank^a, PIERRART Céline^a, MAJAD Lamia^b, EL MEJDOUB Thami^a,
Destain Jacqueline^a, THONART Philippe^a

^aUniversité de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Bio-industries/CWBI, Passage des Déportés 2,
B-5030 Gembloux, Belgique

^bTHT Research, Parc scientifique Créalys, Rue Camille Hubert, 17, B-5032, Gembloux, Belgique

Mots-clés : cytométrie en flux, bioréacteur, atomisation, bactéries lactiques

1. Introduction

La cytométrie en flux est une technique permettant d'effectuer des analyses au niveau des cellules individuelles. Cette technique a été développée à l'origine pour l'analyse de cellules animales dans des applications à finalité médicale. Ce n'est que dans les années 90 que cette technique a été considérée dans le cadre des cellules microbiennes procaryotes et eucaryotes. Grâce à l'évolution des technologies (laser à l'état solide, progrès dans la maîtrise des micro-écoulements,...), plusieurs développeurs proposent actuellement des cytomètres en flux pour des budgets abordables (environ 30.000 euros). Cette évolution entraîne actuellement un engouement des industriels pour la mise en œuvre de cette technique pour le suivi de l'évolution des populations microbiennes dans divers procédés : brasserie, vinaigrierie, production de starters pour la boulangerie, production de starters lactiques,... L'intérêt manifesté pour cette technique est simple à comprendre si on considère les techniques actuelles pour l'estimation de la viabilité cellulaire. En effet, celles-ci reposent souvent sur la revivification des cellules sur milieu gélosé et comptage des colonies après un temps d'incubation. Le problème fondamental de cette technique repose sur l'utilisation de conditions de culture qui ne sont pas forcément identiques à celle rencontrée au niveau du processus de production. Ce phénomène entraîne une sous-estimation des cellules microbiennes actives rassemblées sous le terme de "viables mais non cultivables" (Booth I.R., 2002). A cela s'ajoutent des problèmes techniques imposés par le temps de remise en culture et l'obtention des résultats bien après que le processus de production soit terminé, ainsi que par des procédures de laboratoire coûteuses en personnel et en consommables. La cytométrie s'impose donc comme une technique de choix qui permet d'analyser les cellules microbiennes individuelles sans étape de remise en culture et avec un débit expérimental élevé (Nebe-von-Caron G., 2000, Diaz, 2010). En effet, 30.000 cellules peuvent être analysées en 30 secondes immédiatement après la prise d'échantillon, ce qui permet éventuellement de corriger les conditions de procédés en fonction de l'état des micro-organismes. L'utilisation de fluorochromes spécifiques permet l'analyse de caractéristiques cellulaires. Dans le cas des bactéries lactiques, l'utilisation du couple de colorant "carboxyfluorescéine diacétate" / "iodure de propidium" (cFDA/IP) est mis en œuvre en routine pour la détermination de la viabilité cellulaire (Rault, 2007, Smelt, 2002, Bunthof, 2001). L'iodure de propidium pénètre dans les cellules ayant une membrane endommagée et les colore en rouge, tandis que le cFDA est un composé non fluorescent qui diffuse au travers de toutes les membranes cellulaires et est hydrolysées par les activités estérases intracellulaires pour donner un composé fluorescent vert. Ces deux composantes de fluorescence peuvent être facilement caractérisées par analyse multi paramétrique au niveau d'un cytomètre en flux. La difficulté majeure que rencontre l'application de la cytométrie en flux au niveau industriel réside dans l'interprétation des résultats. Dans ce travail, trois souches de bactéries lactiques ayant des sensibilités différentes au stress de procédé ont été mise en œuvre dans des schémas de production industriels faisant intervenir les étapes suivantes : production en bioréacteur agité de 2m³, récolte par centrifugation continue, congélation et lyophilisation. L'analyse par cytométrie en flux montre

des tendances fondamentalement différentes pour les trois types de micro-organismes. Les deux souches microbiennes plus sensibles au stress de procédé (*Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) du fait de leur caractère anaérobie strict ou microaérophile montrent des sous-populations bien distinctes au niveau des cytogrammes, tandis que la souche plus résistante ne montre qu'une seule population évoluant suivant les étapes du procédé. Ces observations sont utilisées pour une meilleure interprétation des cytogrammes pour l'estimation de la viabilité cellulaire en conditions de procédé. Une meilleure interprétation peut également être obtenue en considérant la possibilité de relargage des produits de dégradation fluorescents provenant de l'hydrolyse du cFDA en fonction de l'état de la membrane cellulaire (Volkert, 2008).

2. Matériel et méthode

2.1. Souche bactérienne

Les essais d'atomisation sont réalisés sur la souche *Lactobacillus plantarum* CWBI-B659, souche appartenant au Centre Wallon de Biologie Industrielle (Gembloux Agro Bio-Tech, ULG). La souche microbienne est stockée sur microbille (VWR cryoinstant mixed) à -80°C et est remise en culture sur 4 boîtes de milieu Man-Rogosa-Sharp agar (MRSA) à 37°C avant chaque expérience.

2.2. Culture liquide en bioréacteur

Quatre à 5 colonies sont prélevées sur les boîtes et sont mises en culture dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 150 ml de milieu Man-Rogosa-Sharp liquide (MRSI). Les 3 cultures liquides sont incubées durant une nuit à 37°C . Cinquante ml de la culture liquide dont la DO à 600 nm est de 10 sont utilisés pour inoculer 1 litre de milieu MRS liquide. Cette seconde culture est incubée durant 8 heures à 37°C avant d'être utilisée pour inoculer un bioréacteur de 20 L (16 L de volume utile) dans les conditions standards. Le réacteur de 20L sert à inoculer le fermenteur principal de 2m^3 (1600L de volume utile). La fermentation est réalisée durant 16 heures à 37°C sous une agitation de 80 RPM (min^{-1}) et une aération de surface de 1 VVM (volume d'air par volume de liquide par minute). Le pH est régulé à la valeur de 6 à l'aide d'une solution de KOH 50 %. Le milieu de culture utilisé est un milieu à base de corn steep liquor. Les cellules en phase stationnaire de croissance sont récupérées par centrifugation à 7330 g pendant 20 minutes et sont diluées avec de l'eau peptonée de manière à obtenir une crème à environ 20 % de matière sèche. Un dénombrement microbiologique et une observation microscopique sont réalisés sur la culture finale ainsi que sur la crème bactérienne. Une mesure de la matière sèche est aussi réalisée sur la crème bactérienne. La crème bactérienne est ensuite congelée avant d'être lyophilisée. La poudre bactérienne sèche obtenue est alors conservée pour l'analyse de la viabilité par cytométrie en flux. Le schéma d'opérations unitaires du procédé est illustré à la figure 1.

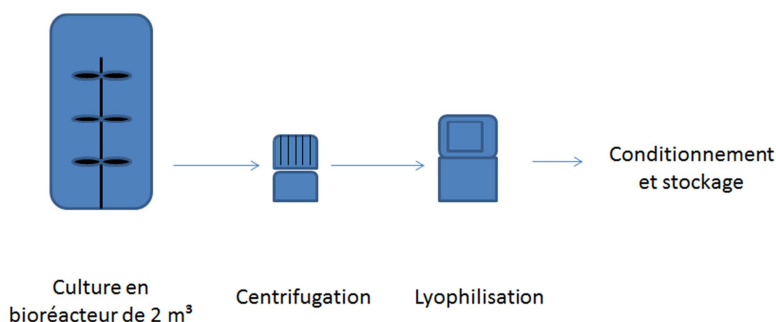


Figure 1: schéma d'opérations unitaires pour la production de starters lactiques. Dans le cadre de ce travail, des prélèvements cellulaires ont été effectués au niveau de la fin de culture en bioréacteur de 2m^3 , de la sortie centrifugeuse, de la pâte bactérienne congelée avant lyophilisation, de la poudre bactérienne après lyophilisation et à différents temps de stockage de la poudre obtenue

2.5. Comptage microbiens sur boîte de Pétri

Les dénombrements bactériens sur la culture finale sont réalisés par prélèvement d'un ml de suspension cellulaire qui est dilué de 10 en 10 dans de l'eau peptonée stérile. Cinquante μ l des trois dernières dilutions sont déposés sur boîtes de Petri contenant du milieu MRSA (manipulations réalisées en triple exemplaire). Les dénombrements sur les crèmes bactériennes et sur les poudres sont réalisés par prélèvement de 1 g d'échantillon mis en suspension dans 9 ml d'eau peptonée puis dilués de 10 en 10 après 15 minutes d'hydratation.

2.6. Cytométrie en flux

Les cellules microbiennes récoltées en cours de procédé sont centrifugées et remise en suspension dans un tampon PBS à pH 7. Les cellules sont ensuite colorées avec une solution de cFDA à 0,0217 mM dans le DMSO et une solution d'IP à 1,5 mM dans de l'eau distillée. Après un temps d'incubation de 15 minutes à 30°C, les cellules sont lavées deux fois avec du tampon PBS. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (FACscan).

3. Résultats et discussion

Le test de coloration utilisé couramment pour l'établissement d'un protocole de viabilité microbienne dans le cas des bactéries lactiques repose sur l'emploi du couple cFDA/IP. Le cFDA est un composé qui diffuse au travers des membranes cellulaires et qui est hydrolysé par l'activité estérase intrinsèque. Le produit d'hydrolyse conduit à un composé fluorescent vert. Cette fluorescence verte peut être aisément mesurée par cytométrie en flux grâce à un laser d'excitation (dans notre cas fonctionnant à 488 nm) et à un photomultiplicateur (FL-1) adaptés. De manière générale, les cellules métaboliquement actives ont tendance à développer une fluorescence verte plus importante. Le second colorant utilisé et l'IP qui diffuse au travers des membranes endommagées et s'intercale de manière irréversible au niveau de l'ADN de la cellule. Les cellules non viables sont alors colorées en rouge, couleur qui peut être de nouveau aisément détectée au niveau d'un cytomètre en flux standard (photomultiplicateur FL-3).

La première étape lors de l'établissement d'un protocole de cytométrie en flux est l'obtention d'échantillons cellulaires pouvant servir de témoins. Dans le cas d'un test de viabilité cellulaire, deux témoins au moins sont requis : l'un pour déterminer la zone du cytogramme comprenant les cellules viables et cultivables, l'autre servant à déterminer la zone correspondant aux cellules non viables. Le premier type de témoin sert à repérer la zone de viabilité cellulaire sur un cytogramme. Généralement, ce témoin est obtenu en analysant et en colorant des cellules microbiennes cultivées en fiole et récoltée en phase exponentielle. Le témoin non viable est quant à lui généralement obtenu en traitant un échantillon cellulaire à la chaleur à 60°C pendant 30 minutes. Un exemple de coloration de ces témoins est montré à la figure 2. Ce protocole de coloration montre donc bien des différences marquées au niveau des colorations des deux types cellulaires, les cellules viables étant colorées en vert et les cellules non viables étant colorées en rouge.

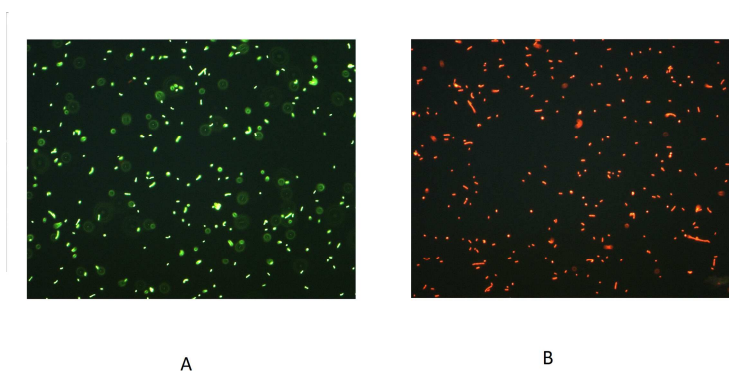


Figure 2: photographies obtenues au microscope à fluorescence pour A : des cellules de *L. plantarum* récoltées en phase exponentielle et colorées au cFDA/IP B : des cellules traitées à 60°C pendant 30 minutes et colorées au cFDA/IP

Néanmoins, des différences entre espèces sont observées quand les cellules sont passées au cytomètre en flux. Les résultats sont montrés à la figure 3 pour les trois souches étudiées. De manière générale, le couple cFDA/IP ne montre pas de différences significatives dans le cas des échantillons traités à la chaleur, ceux-ci montrant une seule population avec un paramètre FL-1 (fluorescence verte) peu intense et un paramètre FL-3 (fluorescence rouge due à l'IP) très intense. Néanmoins, des différences entre types cellulaires sont marquées au niveau des témoins viables. Dans ce cas, la composante FL-1 est la plus intense, mais l'on peut observer une dérive vers le paramètre FL-3 due à un recouvrement spectral des deux colorants utilisés. Ce phénomène de déplacement vers le canal FL-3 diffère entre les espèces bactériennes considérées, avec le déplacement le plus intense observé dans le cas de *L. bulgaricus*. Ce phénomène peut être attribué à plusieurs facteurs dont la taille des bactéries qui diffère d'une espèce à l'autre, mais aussi la capacité de résistance. En effet, ces bactéries ont été cultivées en fiole, en conditions micro aérophiles (fiole sans agitation). Il est bien connu que *L. plantarum* tolère mieux la présence de l'oxygène que les deux autres espèces considérées ce qui pourrait expliquer la diffusion de faible quantité d'IP dans ce cas. Ce phénomène n'est pas visible par analyse qualitative en microscopie, mais a un impact sur les analyses effectuées par cytométrie en flux.

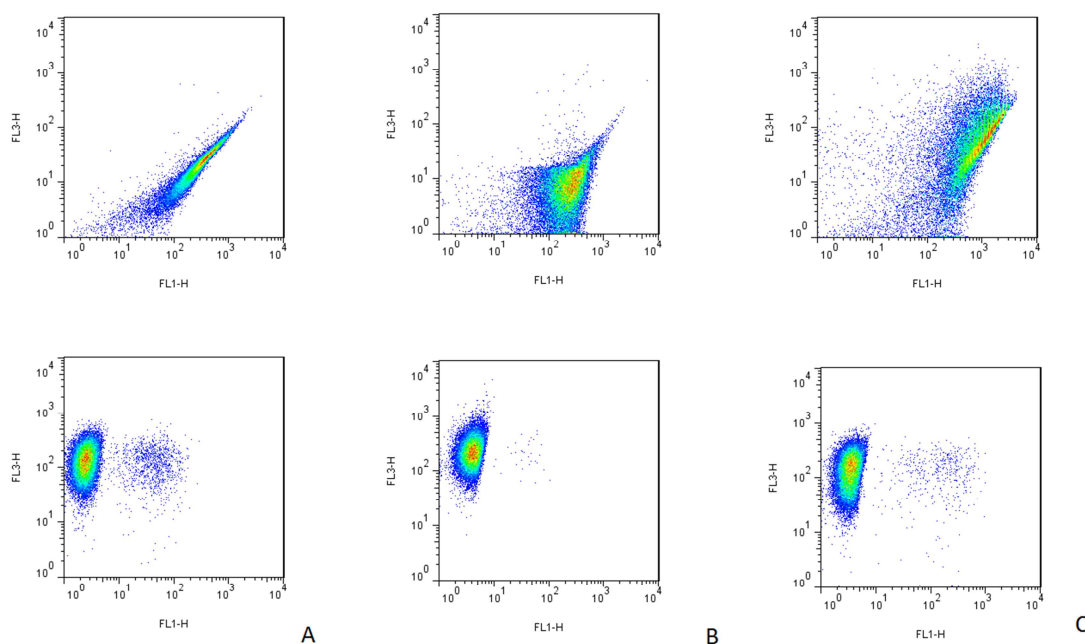


Figure 3: cytogrammes obtenus suite à la coloration de différentes espèces de bactérie lactique par le système cFDA/IP A : *Lactobacillus plantarum* B : *Lactobacillus acidophilus* C : *Lactobacillus bulgaricus*. Les cytogrammes du haut correspondent à des échantillons cellulaires récoltés en phase exponentielle lors d'une culture en fiole (témoin supposé viable et cultivable). Les échantillons du bas correspondent à des cellules inactivées par un traitement thermique à 60°C pendant 30 minutes (témoin supposé non viable)

Ces considérations ont un impact important quand on considère une population microbienne stressée montrant simultanément les phénotypes viables et non viable (figure 4).



Figure 4: photographie obtenue par microscopie à fluorescence suite à la coloration d'un échantillon de *L. plantarum* lors d'un stockage après lyophilisation.

L'analyse par cytométrie en flux a été appliquée au suivi du procédé de production de starters lactiques (Figure 5).

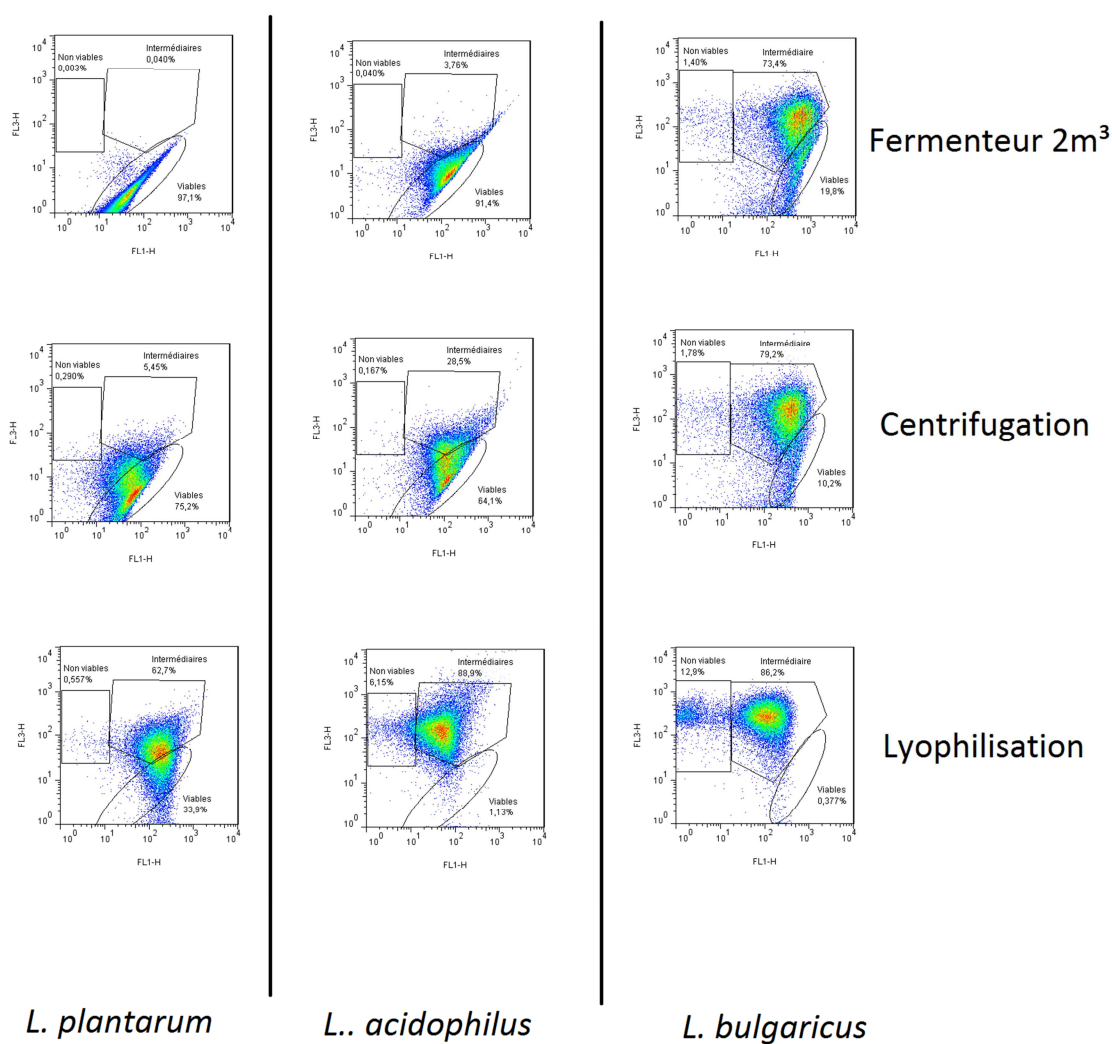


Figure 5: cytogrammes obtenus suite à la coloration de différentes espèces de bactérie lactique par le système cFDA/IP en cours de procédé. Trois sous-populations ont été considérées : viables, intermédiaires et non-viables

Dans tous les cas, une forte proportion de sous-population intermédiaire est observée en cours de procédé de production. Cette sous-population entraîne une déviation de la correspondance entre les comptages par cytométrie et ceux effectués en considérant la technique classique d'étalement sur boîte de Pétri. CE phénomène est probablement dû à la présence de cellules ayant développés le phénotype « viable mais non cultivable » qui est décrit de plus en plus dans la littérature (Abee, 1999). Ces cellules développent un comportement intermédiaire avec des caractéristiques de cellule viable, telle qu'une membrane cellulaire intègre et des caractéristiques de cellules non viables, comme par exemple une activité intracellulaire enzymatique réduite. Ces deux caractéristiques ont un impact direct sur le test de coloration cFDA/IP mis en œuvre, ce qui rend l'analyse par cytométrie en flux ardue.

4. Conclusions

La cytométrie en flux est une technique permettant de caractériser rapidement la viabilité à l'échelle de la cellule microbienne. Elle permet d'économiser un temps précieux par rapport aux techniques microbiologiques classiques qui nécessitent la remise en culture des micro-organismes. Cette technique peut aisément être utilisée au niveau d'un procédé industrie de production de starter lactique comme le montre ce travail. La problématique de la cytométrie en flux pour la détermination de la viabilité cellulaire est la présence d'une sous-population intermédiaire lors de l'évolution des cellules dans le procédé industriel de séchage et de stockage. Une voie d'investigation intéressante impliquerait l'utilisation d'un cytomètre en flux muni d'un trieur cellulaire. Cet appareil permet de récolter physiquement les cellules microbiennes en fonction d'une simple discrimination effectuée par l'opérateur au niveau du cytogramme. La remise en culture des fractions cellulaires récoltées permettrait en effet d'élucider le caractère viable et non cultivable des échantillons récoltés en cours de procédé.

5. Références

- ABEE, T., WOUTERS, J.A., 1999. Microbial stress response in minimal processing. *International journal of food microbiology*, 50, 65-91.
- BOOTH I.R. 2002. Stress and the single cell : intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International journal of food microbiology*, 78, 19-30.
- BUNTHOF, C. J., BLOEMEN, K., BREEUWER, P., ROMBOUTS, F.M., ABEE, T., 2001. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 67, 2326-2335.
- DIAZ, M., HERRERO, M., GARCIA, L.A., QUIROS, C., 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical engineering journal*, 48, 385-407.
- NEBE-VON-CARON G., S. P. J., HEWITT C.J., POWELL J.R., BADLEY R.A. 2000. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *Journal of microbiological methods*, 42, 97-114.
- RAULT, A., BÉAL, C., GHORBAL, S., OGIER, J.C., BOUIX, M., 2007. Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology*, 55, 35-43.
- SMELT, J. P. P. M., OTTEN, G.D., BOS, A.P., 2002. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of *Lactobacillus plantarum*. *International journal of food microbiology*, 73, 207-212.
- VOLKERT, M., ANANTA, E., LUSCHER, C., KNORR, D., 2008. Effect of air freezing, spray freezing and pressure shift freezing on membrane integrity and viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of food engineering*, 87, 532-540.